Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

Untersuchungen über Faktoren, die die Beweglichkeit von Pasteurella pseudotuberculosis beeinflussen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Jürgen Lohe
Tierarzt aus Guben

Berlin 1966
Journal-Nr. 526

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

Untersuchungen über Faktoren, die die Beweglichkeit von Pasteurella pseudotuberculosis beeinflussen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Jürgen Lohe
Tierarzt aus Guben

Berlin 1966
Journal-Nr. 526

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch

Referent: Prof. Dr. H. Hartwigk

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. M.Lerche

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der Promotion: 10. 2. 66

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 1

Schrifttum 3

Eigene Versuche 10

Material 10
Methode und Technik 11

Ergebnisse 15

Abschnitt I Untersuchungen mit dem Hellfeldmikroskop 15

1. Beweglichkeit von P.pseudotub. bei verschiedener Bebrütungstemperatur und Zeit auf gewöhnlichem Nähragar 15
2. Beweglichkeit von P.pseudotub. auf gewöhnlichem Nähragar, Konradi-Drigalski-Agar, in Nähr- und Traubenzuckerbouillon unter aeroben Bedingungen 19
3. PH-Wert des Nährmediums und Temperatur und ihre Auswirkung auf die Beweglichkeit von P.pseudotub. 23
4. Einfluß von Kohlehydraten in gewöhnlicher Nährbouillon auf das Wachstum und der Beweglichkeit von P.pseudotub. 27
5. Wachstum und Beweglichkeit von P.pseudotub. bei Vermehrung unter anaeroben Bedingungen und im mikroaerophilen Milieu 29

Abschnitt II Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop

Technische Vorbemerkungen mit Literatur 31
Material und Methoden 33
Ergebnisse 35

Besprechung 39

Zusammenfassung 44

Literaturverzeichnis 46

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0095

Einleitung

Die Pasteurella pseudotuberculosis (P.pseudotub.) ist die einzige Spezies in der Familie der Brucellaceae (Bergey 1957), die sich durch Beweglichkeit auszeichnet. Als Erreger der Pseudotuberkulose (Rodentiose) der Nagetiere, Vögel, (Puten, Tauben) und anderer Tierarten seit langem bekannt, hat dieser Keim ein erneutes Interesse dadurch gewonnen, daß er bei bestimmten Erkrankungsformen der Appendicitis des jugendlichen Menschen nachgewiesen und als Erreger dieses Leidens angesehen wurde (Masshoff, Knapp u.a.).

Die P.pseudotub. ist durch bestimmte morphologische, biochemische und kulturelle Eigenschaften charakterisiert. Mittels serologischer Untersuchungen werden fünf Serotypen unterschieden. Beim Mensch und Tier kommt am häufigsten der Typ I vor. Von den morphologischen Eigenschaften ist abgesehen vom gramnegativen Verhalten, die Beweglichkeit als konstante Eigenschaft für die Differenzierung von besonderer Bedeutung.

Obwohl der Erreger schon seit ungefähr 1890 als "Pfeifferscher Bazillus" bekannt ist, dauerte es noch Jahrzehnte, bis die Beweglichkeit als Speziesmerkmal eindeutig festgestellt wurde. Die Nachweismethoden für die Beweglichkeit mögen nicht zuverlässig gewesen sein, andererseits aber war die Beweglichkeit weitgehend davon abhängig, unter welchen Bedingungen die Vermehrung der Keime erfolgte. Untersuchungen an anderen beweglichen Bakterien, - wie beispielsweise der Listeria monocytogenes -, haben gezeigt, daß an das Nährsubstrat und an die Bebrütungstemperatur bestimmte Anforderungen gestellt werden müssen, um die Beweglichkeit optimal in Erscheinung treten zu lassen. Ähnliche Verhältnisse dürften auch für die Ausbildung der Beweglichkeit bei P.pseudotub. in Betracht kommen.

Mir wurde die Aufgabe gestellt zu prüfen, welcher Art die Faktoren sind, die einen Einfluß auf die Beweglichkeit haben. Dabei kam es darauf an, zunächst ein Nährsubstrat zu finden, das die Beweglichkeit gut hervortreten ließ. Ferner

sollte die Frage untersucht werden, welche Bebrütungstemperaturen und Bebrütungszeiten für die Beweglichkeit als optimal gelten können. Inwieweit pH-Wertänderungen des Nährsubstrates oder Spaltprodukte von verschiedenen Kohlenhydraten einen Einfluß auf die Beweglichkeit nehmen, war ebenfalls zu prüfen.

Die mir gestellte Aufgabe setzte voraus, daß eine Beurteilungsgrundlage für die Beweglichkeit der P. pseudotub. gefunden wurde. Um sicher zu sein, daß diese Grundlage auch objektiv war, sollte durch elektronenmikroskopische Darstellung der Geißeln kontrolliert werden, inwieweit das gefundene Beurteilungsschema durch die Zahl und den Ausbildungsgrad der Bewegungsorganellen bestätigt werden konnte.

Schrifttum

Der Erreger der Pseudotuberkulose der Nagetiere (Rodentiose) hat in seiner Bezeichnung zahlreiche Wandlungen durchgemacht. Nach Haupt (9) hat Eisenberg 1891 für diese Keimart zuerst das Epitheton speciale "pseudotuberculosis" vorgeschlagen. Preiß (1894) sprach von "pseudotuberculosis rodentium", nachdem vorher Pfeiffer (1889) die Bezeichnung "Bacillus der Pseudotuberkulose der Nagetiere" gebraucht hatte. Topley und Wilson (zit.n.Haupt) stellten 1931 und 1936 den Keim zur Gattung Pasteurella und prägten die Bezeichnung P.pseudotuberculosis, die in die Systematik von Bergey (1) aufgenommen worden ist. Prévot (zit.n.Haupt) hat 1948 den Erreger als Cillopasteurella pseudotuberculosis bezeichnet, und zwar deshalb, weil dieser Keim im Gegensatz zu allen sonstigen Pasteurellen Geißeln besitzt und beweglich ist.

Vor 1910 und in den späteren Jahren war die Frage der Beweglichkeit der P. pseudotuberculosis oft umstritten. Dies lag offenbar daran, daß man nicht ausreichend die Voraussetzung kannte, unter denen man bei der Züchtung des Keimes auf künstlichen Nährmedien eine optimale Beweglichkeit erwarten konnte. In einer Arbeit von Kossel und Overbeck aus dem Jahre 1902 (zit. n. Weitzenberg) findet sich zum ersten Mal die Angabe, daß der Keim beweglich ist. Schütze (19) konnte 1928 den Nachweis erbringen, daß bei P.pseudotuberculosis O- und H-Antigene vorliegen, wenn die Züchtung bei Zimmertemperatur vorgenommen wurde.

1932 wies Kauffmann (10) nach, daß 5 serologische Typen dieses Erregers vorkommen. Alle Typen besitzen ein gemeinsames O- und H-Antigen. Mit dem Vorliegen eines oder zweier weiterer O-Antigene rechnete Kauffmann bei den einzelnen Typen.

1934 beschäftigte sich Weitzenberg (25) mit der Frage der Beweglichkeit von P.pseudotuberculosis. Er untersuchte 25 verschiedene Stämme und stellte fest, daß 24 Stämme bei Züchtung bei Zimmertemperatur beweglich waren. Weitzenberg beschreibt den Keim als begeißeltes bei Zimmertemperatur meist "gut bewegliches Bakterium". Ihm gelang die Geißeldar-

stellung bei 24 Stämmen. Doch beobachtete der Autor, daß die Beweglichkeit der Keime bei den einzelnen Stämmen erheblichen Schwankungen unterliegen konnte. Er betonte aber, daß "kein Stamm gänzlich oder dauernd unbeweglich war".

Weitzenberg gibt einen sehr guten Überblick über die bis 1934 über die Frage der Beweglichkeit vorliegende Literatur. Er beschäftigte sich mit verschiedenen Faktoren, die auf die Ausbildung des Geißelapparates einen Einfluß haben. Unbeweglichkeit sonst gut beweglicher Stämme trat bei etwa 27°C ein. Die Luftfeuchtigkeit schien keine erhebliche Wirkung auf die Beweglichkeit zu haben. Bei im Keller bei Temperaturen von etwa 8-15°C gezüchteten Stämmen war die Beweglichkeit stets gut. Weitzenberg züchtete seine Stämme bei +3°, +8° und +20°C und stellte fest, daß die Beweglichkeit bei +3° und +8°C nicht besser war als bei +20°C.

Die Wachstumsdauer von 18 und 48 Stunden war für die Beweglichkeit am günstigsten. Ferner zeigte sich, daß eine höhere Temperatur auf die Beweglichkeit einen schädigenden Einfluß hatte. Bei 37°C bebrüteten unbeweglichen Keimen trat Beweglichkeit auf, wenn diese Kulturen aus dem Brutschrank herausgenommen und bei Zimmertemperatur gehalten wurden. Schon nach 5 Stunden zeigten sich in diesem Falle bewegliche Bakterien und nach 12 Stunden war eine gute Beweglichkeit vorhanden.

Durch Tierpassagen und Zusätze von Kohlehydraten (0,1 - 1%) oder Glycerin (0,05 - 2,0 cm^3 zu 10 cm^3 Bouillon) konnte keine bessere Beweglichkeit erzielt werden. Ebenso blieb ein Erfolg bei Zusatz von 1% Serum zu festen Nährböden aus. Eine Züchtung unter anaeroben Bedingungen hatte ebenfalls keinen fördernden Einfluß auf die Beweglichkeit.

Zur Darstellung der Geißeln benutzte der Autor die Originalfärbemethode von Zettnow. Dabei wurden die Keime bei den für die Beweglichkeit günstigen Temperaturen von etwa 18°C auf Agarplatten über 24-36 Stunden vermehrt. Bei kleinen und großen Bakterienformen gelang der Nachweis von Geißeln, die gewellt waren. Ein- und zweigeißelige Bakterien waren am häufigsten. Dreigeißelige Keime wurden selten beobachtet, Zellen mit vier, fünf und sechs Geißeln kamen gele-

gentlich vor, auch kokkenförmige Bakterien wurden beobachtet. An einer Bakterienzelle mit sechs Geißeln konnte ein ringartiges Gebilde beobachtet werden, das als aufgerollte Geißel angesprochen wurde. Diese ringartigen Geißeln konnten seltener auch bei anderen Zellen festgestellt werden. Die Anheftung der Geißeln war häufig extrapolar. Geißelbüschel, wie sie Levinthal (12) gesehen hatte, wurden selten gesehen.

Thal (22,23) hat sich 1954 in einer ausgezeichneten Arbeit mit der serologischen Typisierung einer großen Zahl von Stämmen, die aus den verschiedenen Tierarten gewonnen worden waren, beschäftigt. Er bestätigte dabei die schon von Schütze beschriebenen Serotypen IA, IB, IIA, IIB, III und fügte diesen noch die Typen IV und V hinzu.

Nach Thal gilt folgendes Antigenschema:

Serotypen	O-Antigene artspez.	O-Antigene typenspez.	O-Antigene subtypenspez.	H-Antigene
IA	1	2	3	a
IB	1	2	4	a
II A	1	5	6	a
II B	1	5	7	a
III	1	8	-	a
IV	1	9	-	a
V	1	10	-	a

In der neueren Zeit hat Knapp (11) die Frage der Beweglichkeit von P.pseudotuberculosis bei Stämmen, die vom Menschen isoliert worden waren, noch einmal aufgegriffen. Er prüfte seine Stämme auf Beweglichkeit mit dem Verfahren der Durchwanderung der Keime durch einen weichfesten Nähragar, den er in ein u-förmiges Röhrchen, das sogenannte Valhne-Röhrchen, gebracht hatte. Die Agarsäule wurde an der Oberfläche des einen Schenkels mit Keimen beimpft, um dann festzustellen, innerhalb welcher Zeit die Keime an der Oberfläche des Agars in dem anderen Schenkel angelangt waren. Bei kurzer Durchwanderungszeit wurde eine starke Beweglichkeit angenommen, bei längerer Zeit mit einer geringeren Beweglichkeit gerechnet. Knapp kam zu dem Ergebnis, daß alle seine Stämme beweglich waren, glaubte aber, daß die humanen

Stämme geringer beweglich sein würden als die vom Tier isolierten Stämme.

Haupt (9) beschreibt die bei Nagetieren und anderen Tierarten (Geflügel, Katze) sowie beim Menschen vorkommenden P.pseudotub. als gramnegative, sporenlose Stäbchen ohne Kapsel mit 2 - 6 (selten mehr) Geißeln, die parapolar oder peritrich angeordnet sind. Ein Wachstum erfolgt aerob oder mikroaerophil. Das ph-Optimum liegt bei 6-8, für den Nachweis der Beweglichkeit zwischen 7 - 7,3. Das Temperaturoptimum für die Züchtung wird mit +30°C (min. +4°C, max. +43°C) angegeben. Für die Erstzüchtung wird 20 - 30°C empfohlen, weil bei Züchtung bei 37°C Neigung zur R-Dissoziation besteht. Auf Nähragar entstehen nach 24-stündiger Bebrütung 0,25-1,0 mm Ø große, glatte bis schleimige Kolonien, die allmählich größer werden und bei 37°C am Rand auswachsende Rauhformen aufweisen.

Zur Isolierung empfiehlt Haupt laktosehaltige Nährsubstanzen mit Säure-Basen-Indikator, da ein Wachstum stets einen Umschlag des Indikators nach der alkalischen Seite hin bewirkt.

Von den biochemischen Eigenschaften sind nach Haupt bedeutsam: die Spaltung von Glukose ohne Gasbildung, die Spaltung von Salizin, Adonit, Melibiose, Rhamnose und Harnstoff. Indol wird nicht gebildet. Die Methylrotprobe ist positiv, die Voges-Proskauerprobe negativ. Citrat wird als alleinige Kohlenstoffquelle nicht genutzt. Milch wird nicht verändert, Lackmusmilch schwach alkalisch, Gelatine nicht verflüssigt. Der Keim wächst ohne Haemolyse auf der Blutplatte.

Nach Haupt ist die Eigenbewegung nach der Züchtung bei 18 - 22°C mikroskopisch und durch Kultur im halbfesten Agar nachweisbar. Auf feuchter Agaroberfläche läßt sich ein "Schwärmen" des Keimes feststellen. Nach Züchtung bei 37°C fehlt die Eigenbewegung.

Im Jahre 1952 erschien von N.W.Preston und H.B.Maitland (18) eine Arbeit über den Einfluß der Temperatur auf die Beweglichkeit von Pasteurella pseudotuberculosis. Die Autoren züchteten ihren Stamm, der aus einem Meerschweinchen

isoliert worden war, bei 22°C und bei 37°C. Dabei war der Stamm bei 22°C beweglich, so daß er im hängenden Tropfen eine gute Beweglichkeit erkennen ließ, sich durch spezielle Geißelfärbung mehrere Geißeln darstellen ließen und Kaninchen bei der Immunisation H-Antikörper bildeten. Bei Pasteurellen, die bei 37°C kultiviert worden waren, fehlten diese Eigenschaften. Die Beweglichkeit ging etwa bei 30°C verloren oder wurde geringer. Die Autoren untersuchten sehr eingehend den Titeranstieg des Serums nach den einzelnen Injektionen. Dazu verimpften sie eine abgetötete Bakteriensuspension, die ungefähr 5×10^8 Keime im Milliliter enthielt in folgenden Dosen: 3 mal je 0,5 ml im Abstand von drei Tagen in der ersten Woche, danach drei Dosen zu je 1,0 ml in der 2. und 3. Woche. Sie erhielten für die H-Antigene Titer von 1:50 000 und für die O-Antigene von 1:5 000. Die Kaninchen verhielten sich jedoch in der Titerbildung unterschiedlich.

Preston und Maitland untersuchten auch den Einfluß des pH-Wertes auf die Beweglichkeit und kamen zu dem Ergebnis, daß durch Veränderung der H-Ionen Konzentration keine Differenzierung der Beweglichkeit zu erreichen ist. Um weiter zu klären, wie die Geißeln bei 37°C verschwinden, gingen sie von der Annahme aus, daß die Geißeln durch ein Enzym, das bei 37°C wirksam wird, zerstört werden. Ihren Bemühungen, ein derartiges Enzym zu finden, blieb der Erfolg jedoch versagt.

Einen breiten Raum widmeten die Autoren in ihren Untersuchungen dem Einfluß der Zeit und Temperatur, wobei sie prüften, innerhalb welcher Zeit die Beweglichkeit verloren ging, wenn die Keime bei 22°C gezüchtet und danach bei 37°C aufbewahrt wurden. Auch an Kulturen, die bei 37°C bebrütet waren und dann bei 22°C aufbewahrt wurden, stellten sie Untersuchungen an.

Es liegt nahe, Vergleiche bei P.pseudotub. und Listeria monocytogenes über den Einfluß der Temperatur bei der Vermehrung auf die Beweglichkeit anzustellen. Deshalb möge mir gestattet sein, wenige Hinweise aus der sehr umfangreichen

Literatur über L. monocytogenes zu geben.

Seeliger (20) bemerkt in seinem Buch über die Listeriose, daß in Bezug auf die Eigenschaften der Listeria "kaum" in einem Punkt die Befunde so sehr differieren wie in den Angaben über die Beweglichkeit. Dies trifft ebenfalls auch für P.pseudotuberculosis zu.

Die Beweglichkeit der L. monocytogenes ist, wie Seeliger betont, bei Zimmertemperatur am stärksten. Sie wird auch schon bei 30°C beobachtet. Selbst bei +37°C ist sie nicht völlig aufgehoben, sofern man junge Bouillonkulturen im hängenden Tropfen untersucht. In älteren Kulturen wird nur eine kräftige Molekularbewegung gesehen, bei längerer Beobachtung sollen immer wieder einzelne Keime ins Gesichtsfeld gelangen, die aktiv beweglich sind.

Als elegante Methode zum Nachweis der Beweglichkeit beschreibt Seeliger bei L.monocytogenes die Verwendung von 0,2 - 0,4%igen Nähragar im U-Röhrchen nach Valhne. Bei der Beschreibung der Methode spricht Seeliger davon, daß die auf einem Schenkel der Röhrchen eingesäten Keime bei 22° oder 37°C im Laufe von 1 - 2 Tagen durch die Agarsäule hindurchwandern und an der Oberfläche des anderen Schenkels erscheinen. Offenbar legt der Autor bei der Ermittlung der Wanderungsgeschwindigkeit die Beurteilung mit dem bloßen Auge zugrunde, denn er betont, daß sich etwa 0,5 cm unter der Oberfläche beider Schenkel des U-Röhrchens ein Streifen bildet, der aus einer Schicht stärkeren Bakterienwachstums besteht. In dieser Zone einer verminderten Aerobiose zeigen die Schwärmkulturen bessere Entwicklung als unter aeroben bzw. strikt anaeroben Verhältnissen.

Im Traubenzucker-Gelatine-Stich zeigen sich nach Seeliger bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur häufig büschelige Auswanderungszonen, die auf der Beweglichkeit der Listerien beruhen können. Auch auf festen Nährmedien lassen sich an den Rändern der gewachsenen Kolonien nach verlängerter Bebrütung Ausschwärmungserscheinungen beobachten, die nicht mit Rauhkolonien verwechselt werden dürfen.

Über elektronenmikroskopische Untersuchungen an P.pseudotuberculosis, insbesondere zur Darstellung der Geißeln haben wir in der Literatur keine Angaben finden können.

Hartwigk und Grund (8) haben ähnlich wie andere Autoren an dem Geißelapparat von L. monocytogenes elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, wobei sie das Filmbewuchsverfahren und die Tropfenmethode anwendeten und mit Vergrößerungen von 1:7500; 1:15000; und 1:30000 arbeiteten. Die Autoren fanden bei Listerien, die bei 37,5°C bebrütet worden waren und mit der Tropfenmethode untersucht wurden, entweder keine oder wenige Geißeln. Bei Bebrütungstemperaturen von 20°C ließen sich mit der Tropfenmethode regelmäßig Geißeln in unterschiedlicher Zahl nachweisen. Im Höchstfall wurden 4 Geißeln ermittelt, die stets subterminal ansetzten, also für eine peritriche Begeißelung sprachen. Wiederholt zeigten die Geißeln Reifenform, spiralige Formen kamen gelegentlich vor.

Aufgrund ihrer Untersuchungen konnten Hartwigk und Grund die Untersuchungsergebnisse von Mc Gaughey, Paterson, Griffin und Robbins (Lit.S.8) bestätigen. Sie besagen, daß eine größere Zahl von Geißeln bei Listerien, die bei Zimmertemperatur gehalten wurden, zu erwarten sind. Die Untersuchungen zeigen weiterhin, daß der Geißelapparat sehr fragil ist und deshalb bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen sehr variabel sein kann.

Eigene Versuche

Material

Die Untersuchungen wurden an einem Chinchilla-Stamm des Serotypes I nach Kauffmann vorgenommen.

Der Stamm war im Winter 1957 aus einem gestorbenen Chinchilla, das Veränderungen einer Pseudotuberculose an seinen Organen aufwies, isoliert worden und wurde im Institut unter der Bezeichnung 5/57 im Hochschichtagarstich in der Stammsammlung aufbewahrt.

Zunächst erfolgte eine Anzüchtung auf gewöhnlichem Nähragar, Konradi-Drigalski-Agar und Albimi-Agar (Difco). Dabei wurde der Stamm auf Reinheit und auf seine morphologischen und kulturellen Eigenschaften geprüft. Es handelte sich um gramnegative Stäbchen, die überwiegend von kurzer Gestalt waren. Zwischen diesen Stäbchen waren hier und da Fäden unterschiedlicher Länge zu beobachten, die keine Querteilung erkennen ließen. Bei Färbung mit Löffler's Methylenblau trat eine bipolare Färbung bei den Kurzstäbchen öfter hervor. Im Nativpräparat wurde bei Bebrütung bei 37°C keine Beweglichkeit festgestellt, diese war aber bei einzelnen Keimen regelmäßig vorhanden, wenn die Bebrütung für 24 Stunden bei 22°C durchgeführt worden war.

Der Keim wuchs auf gewöhnlichem Nährboden bei 37°C und 22°C. Bei der Beimpfung der Nährbodenoberfläche mit der Öse kam es in den Impfstrichen zur Entstehung eines dichten Rasens, an dessen Peripherie sich einzeln stehende größere Kolonien entwickelten, die die typischen Koloniemerkmale zeigten. Die Kolonien waren bis stecknadelkopfgroß, rund, feuchtglänzend, grauweiß und undurchsichtig. Sie hatten stets einen glatten Rand, lagen also in S-Form vor. Auf Konradi-Drigalski-Agar wiesen die Kolonien einen bläulichen Farbton infolge Alkalibildung auf. Auf den Frischblutagarplatten (Zusatz von 10% defibriniertem Hammelblut) wuchsen die Kolonien ohne Haemolyse. Auf der Gaßner-Platte war das Wachstum deutlich gehemmt. Auf dem Albimi-Agar (Difco) waren im Wachstum keine Unterschiede gegenüber der gewöhnlichen Nähragarplatte zu bemerken. Je nach Stärke des Wachstums war auf allen Festnähr-

böden ein spermaähnlicher Geruch wahrnehmbar. In der gewöhnlichen Nährbouillon zeigte sich eine durchgehende Trübung mit geringem griesigen Bodensatz. Der Bodensatz ließ sich durch Aufschütteln leicht verteilen, wobei es zur starken Trübung kam. Bei verlängerter Bebrütung kam es zu einer zunehmenden Klärung der Bouillon unter Bildung eines kräftigen Bodensatzes.

Die biochemische Prüfung in Peptonwasser mit Bromthymolblau als Indikator ergab eine Vergärung von Dextrose, Lävulose, Galaktose, Arabinose, Maltose, Rhamnose, Mannit und Trehalose ohne Gasbildung. Saccharose, Laktose, Inulin, Dulcit, Sorbit, Raffinose und Adonit wurden nach 48-stündiger Bebrütung nicht fermentiert. Indol wurde nicht gebildet.

In allen sonstigen Eigenschaften stimmte der Keim mit der P.pseudotub. überein.

Methode und Technik

Für die Feststellung von Einflüssen, die für die Beweglichkeit der P.pseudotub. von Bedeutung sind, wurde die Vermehrung des Keimes auf verschiedenen Nährmedien und bei verschiedenen Bebrütungstemperaturen durchgeführt. Während der Bebrütungszeit wurde der Keim in bestimmten Intervallen auf seine Beweglichkeit hin geprüft.

Die Beweglichkeit wurde mit einem Hellfeldmikroskop (Zeiß) bei einer Vergrößerung von 8 x 100 (Ölimmersion) mit abgeblendetem Gesichtsfeld und geringgradig nach unten beweglichen Kondensor im hängenden Tropfen kontrolliert. Anfangs wurden die Ergebnisse durch Untersuchungen im Phasenkontrast- oder Dunkelfeldmikroskop kontrolliert. Da hierbei stets die im Hellfeld erzielten Ergebnisse bestätigt werden konnten, wurden die Untersuchungen später nur noch mit dem Hellfeldmikroskop durchgeführt.

Zur Untersuchung im hängenden Tropfen verwendeten wir normale Hohlschliffobjektträger und Deckgläser. Auf die Deckgläser gaben wir an alle vier Ecken eine kleine Menge einer weichfesten Vaseline. In die Mitte des Gläschens

brachten wir mit der Platinöse einen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung und verrieben darin mit Hilfe der Öse eine ungefähr stecknadelgroße Kolonie. Waren die Keime in einer Bouillon oder in einem weichfesten Agar vermehrt worden, brachten wir mit der Öse einen Tropfen der Bouillonkultur oder des weichfesten Agars auf die Mitte des Deckgläschens. Auf das so vorbereitete Glas legten wir nun den Objektträger mit dem Schliff zum Tropfen. Durch die Vaseline kam das Gläschen am Objektträger zur Haftung. Durch Wenden des Objektglases um 180 Grad wurde das Deckglas nach oben gebracht, so daß der zu untersuchende Tropfen sich an der Unterseite des Deckgläschens befand. Auf das Deckglas wurde ein Tropfen des Immersionsöles gegeben. Die Untersuchung erfolgte stets kurzfristig, so daß mit einer Antrocknung der Bakteriensuspension nicht zu rechnen war.

Jede Kultur wurde zu bestimmter Zeit mindestens dreimal auf Beweglichkeit der Keime überprüft, um Zufallsergebnisse nach Möglichkeit auszuschließen. Eine sehr lebhafte Beweglichkeit (+++) wurde als vorliegend angesehen, wenn über 75% der sichtbaren Keime sich durch das Gesichtsfeld in unterschiedlichen Richtungen bewegten. Bei Bewegung in nur einer Richtung wurde angenommen, daß Diffusionsströmungen eine Beweglichkeit vortäuschten. Für jede Untersuchung wurde das Präparat kurze Zeit im Objekthalter des Mikroskopes belassen, um die Wirkung von Diffusionsströmen möglichst abklingen zu lassen. Mit zwei Kreuzen (++) wurden Kulturen beurteilt, in denen die Hälfte der Keime eine Bewegung in verschiedene Richtungen zeigte. Eine schwache Beweglichkeit (+) lag vor, wenn nur einzelne Keime durch das Gesichtsfeld schwammen. Fehlende Beweglichkeit (-) wurde als gegeben angesehen, wenn von den zahlreichen sichtbaren Keimen kein einziger Keim eine Beweglichkeit zeigte.

Zur Beweglichkeitsprüfung verwendeten wir außer dem hängenden Tropfen noch einen weichfesten Nähragar (1% Traubenzucker, 0,5% Agar ohne Serumzusatz). Dieser weichfeste Nähragar wurde in sogenannte Pasteur'sche Pipetten aufgenommen. Die Pipetten bestanden aus Glasröhren, die einen Durchmesser von 5 mm hatten und in eine Länge von 20 cm zu-

rechtgeschnitten wurden. Über einem Bunsenbrenner wurde die Röhre in der Mitte bis zur Rotglut gebracht und nach Erweichung des Glases ausgezogen, so daß eine lange Kapillare entstand. Aus diesem verengten Teil schnitten wir mit einer Ampullensäge 20 cm lange Stücke heraus und sterilisierten diese im Trockensterilisator bei 160°C. In die Glaskapillare saugten wir nun unter Zuhilfenahme eines Gummiballes den weichfesten Agar bis zu einer Höhe von 15 cm. Danach wurde in die Pipette etwas Kulturmaterial entweder aus einer Bouillon oder von einer auf dem Nährboden gewachsenen Kolonie gesaugt, wobei ein kleiner Luftraum am Ende der Kapillare verblieb und diese an dieser Stelle ohne Schaden für die zu prüfenden Keime zugeschmolzen werden konnte. Das andere Ende der Kapillare war mit einem 1 cm langen Stopfen aus Zellstoff schon vor der Sterilisation verschlossen worden. Die Kapillaren wurden mit dem beimpften Ende nach unten in ein normales Reagenzglas gestellt, das wiederum in einem Reagenzglasgestell im Zimmer oder im Brutapparat aufbewahrt wurde. Als Grundlage für die Beweglichkeit der Keime diente die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Nährbodensäule. Die Wanderungsgeschwindigkeit wurde in halbstündigem Abstand geprüft, indem entweder mit einer langen Platinöse oder einer Kapillare von der Oberfläche der Agarsäule geringe Mengen entnommen und im hängenden Tropfen auf bewegliche Keime kontrolliert wurden.

Die zur Prüfung auf Beweglichkeit verwendeten Nährsubstrate waren:

1. gewöhnlicher Nähragar. Er wurde mittels Fleischextrakt, Pepton, Kochsalz, 2% Agar-Agar hergestellt, Der pH-Wert war 7,2.
2. gewöhnliche Nährbouillon (pH-Wert = 7,2)
3. Traubenzuckerbouillon (mit 1% Dextrose) (pH-Wert=7,2)
4. Konradi-Drigalski-Agar (pH-Wert = 7,4)
5. Frischblutagar. (10% defibriniertes Hammelblut zum gewöhnlichen Nähragar. (pH-Wert = 7,5)

Um fördernde oder hemmende Einflüsse von Kohlehydraten oder deren Zersetzungsprodukten auf die Beweglichkeit fest-

zustellen, wurden der gewöhnlichen Nährbouillon außer Glukose Saccharose, Laktose und Maltose in einer Menge von 1 und 2% zugefügt.

Die Versuche dehnten sich über einen Zeitraum von einem halben Jahr aus. Bei jeder Versuchsreihe wurde von weitgehend unbeweglichen Keimen ausgegangen, wobei die Keime bei 37°C während 24 Stunden vermehrt wurden.

Die Technik der elektronenmikroskopischen Darstellung ist im 2. Abschnitt beschrieben.

Ergebnisse

Abschnitt I

Untersuchungen mit dem Hellfeldmikroskop

1. Beweglichkeit von P.pseudotub. bei verschiedener Bebrütungstemperatur und Bebrütungszeit auf gewöhnlichem Nähragar

Um eine Arbeitsgrundlage zu schaffen, wurde die Vermehrung des Keimes auf einem Nährsubstrat vorgenommen, von dem auf Grund der mit Listeria monocytogenes vorliegenden Erfahrungen anzunehmen war, daß es einen günstigen Einfluß auf die Ausbildung der Beweglichkeit hatte. Ein frischhergestellter gewöhnlicher Nähragar mit einem pH-Wert von 7,2 schien diesen Zweck zu erfüllen.

Da verschiedene Temperaturbereiche überprüft werden sollten, mußte die Einstellung jeder Temperatur über eine bestimmte Zeit gewährleistet sein. Wir bedienten uns eines Klimaschrankes der Firma Köttermann. An dieser Apparatur ist jede Temperatur zwischen -40 und +120° Celsius bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 90% über eine bestimmte Zeit einstellbar. Durch einen Kurvenschreiber ist eine Kontrolle laufend möglich. Nur der Bereich von 0 bis +40°C, der in Abständen von 5° kontrolliert wurde, war bei Intervallen von 6, 18, 24, 36, 42 und 56 Stunden von Interesse.

Die Ergebnisse sind unter Berücksichtigung des Wachstums (W) und der Beweglichkeit (B) in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Züchtung von P.pseudotub. auf gewöhnlichem Nähragar mit einem pH-Wert von 7,2 bei Temperaturen von 0°- 40°C und Zeiten von 6 - 56 Stunden.

Temperatur		6	18	24	36	42	56	Std.
0°	W	-	-	-	-	+	+	
	B	-	-	-	-	+	+	
+5° C	W	-	-	-	+	++	++	
	B	-	-	-	+	+	+	
10° C	W	-	-	+	+	++	++	
	B	-	-	++	++	++	+	
15° C	W	-	+	++	+++	+++	+++	
	B	-	+	++	+++	+++	++	
20° C	W	-	+	+++	+++	+++	+++	
	B	-	++	++	++	-	-	
25° C	W	+	++	+++				
	B	+	-	-				
30° C	W	+	+++	+++				
	B	-	-	-				
37° C	W	+	+++	+++				
	B	-	-	-				
40° C	W	-	+	++				
	B	-	-	-				

Es bedeuten:

W = Wachstum
+++ = Kolonien ungefähr 2 mm im Durchmesser
++ = Kolonien sichtbar etwa 0,5 - 1 mm im Durchmesser
+ = sehr schwaches Wachstum in den Impfstrichen
- = kein Wachstum

B = Beweglichkeit
+++ = 75% der Keime beweglich
++ = 50% " " "
+ = einzelne Keime bewegen sich durch das Gesichtsfeld
- = keine Beweglichkeit an den Keimen erkennbar.

Bebrütungstemperatur und -dauer haben einen wesentlichen Einfluß auf die Beweglichkeit von P.pseudotub. Doch ist die Stärke des Wachstums nicht für die Intensität der Beweglichkeit entscheidend, wie aus den Ergebnissen bei einer Bebrütung bei über +25°C während 18 und 24 Stunden zu ersehen ist.

Bei 0°C ist ein schwaches Wachstum nach 42 bis 56 Stunden zu erkennen, nur einzelne Keime zeigen eine Beweglichkeit.

Bei +5°C ist ein Wachstum schon nach 36 Stunden vorhanden. Die Beweglichkeit der Keime ist gering. Durch eine Verlängerung der Bebrütungszeit auf 56 Stunden bei +5°C läßt sich ein stärkeres Wachstum erzielen, aber keine Steigerung der Beweglichkeit.

Bei +10°C ist das Wachstum nach 24 Stunden gering, etwa 50% der Keime bewegen sich lebhaft. Das Wachstum nimmt bis zur 42. Stunde noch zu, ohne daß die Beweglichkeit der Keime eine weitere Steigerung erfährt.

Bei +15°C zeichnet sich deutlich ein Optimum an Beweglichkeit nach 36 Stunden ab. Das Optimum bleibt bei einer 48-stündigen Bebrütungszeit erhalten. Später geht die Beweglichkeit langsam zurück.

Bei +20°C wird in 24 Stunden ein Optimum an Wachstum erzielt, die Beweglichkeit ist aber nur mittelgradig ausgebildet. Nach 42 Stunden ist die Beweglichkeit der Keime verschwunden.

Bei +25°C ist das stärkste Wachstum nach 24 Stunden erreicht; es fehlt eine Beweglichkeit der Keime. Eine geringe Beweglichkeit der Keime war allerdings bei dieser Temperatur nach 6-stündiger Bebrütungszeit vorhanden.

Bei +30°C tritt nach 18 Stunden ein Maximum an Wachstum ein, die Keime sind unbeweglich. Gleiche Ergebnisse werden bei einer Bebrütung mit 37°C erzielt.

Bei +40°C ist nach 18 Stunden eine merkliche Verzögerung des Wachstums festzustellen und fehlt eine Beweglichkeit der Keime.

Daher kann wohl aus den Versuchen der Schluß gezogen werden, daß ein Optimum der Beweglichkeit bei P.pseudotub.

bei einer 36-stündigen Bebrütung bei 15°C auf gewöhnlichem Nähragar bei einer relativen Feuchte von 90% erreicht wird.

Was die Überprüfung der mit dem Nativpräparat erzielten Ergebnisse bei dem Nachweis der Beweglichkeit in der Pasteurschen Pipette anbetrifft, so war der Zeitpunkt des ersten Nachweises der beweglichen Keime an der Oberfläche der Nährbodensäule in ihrer Menge für die Beurteilung der Beweglichkeit entscheidend. Da die Prüfungen in halbstündigen Abständen aufeinander folgten, gelang es im allgemeinen, die beweglichen Keime dann zu ermitteln, wenn sie zum ersten Male an der Oberfläche erschienen waren. Da jedes Material in drei verschiedenen Pasteur'schen Pipetten geprüft wurde und der Zeitpunkt der Beimpfung feststand, war es durch diese Technik möglich, zu brauchbaren Ergebnissen bei der Beweglichkeitsprüfung zu kommen.

Die Kontrolle der in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse durch den weichfesten Agar in der Pasteur'schen Pipette hatte folgende Ergebnisse:

Tabelle 2

Feststellung der Wanderungszeit von P. pseudotub.bei unterschiedlicher Bebrütungstemperatur durch eine in die Pasteur'sche Pipette vorhandene 15 cm lange Nährbodensäule aus weichfestem Nähragar bei Zimmertemperatur

Bebr. Temp. °C	Bebr.Zeit in Std.	Wanderungszeit d.Bakt.durch d. Nährbodensäule in Std.	
0	42	8	
5	42	8	
10	36	4	optimum
15	36	5	
20	18	24	
25	18	30	

Wie wiederholte Versuche ergaben, war es zwecklos, die auf gewöhnlichen Agar bei über 25°C gewonnenen Kulturen auf Be-

weglichkeit in der Pasteur'schen Pipette zu prüfen, da die ersten beweglichen Keime erst nach 2 Tagen an der Oberfläche der Nährbodensäule erschienen. Diese Zeit konnte nicht mehr für einen Vergleich mit Keimen, die auf gewöhnlichem Nähragar mittels Nativpräparat auf Beweglichkeit geprüft worden waren, herangezogen werden, denn die an der Oberfläche nachweisbaren Keime hatten sich vermutlich in den günstigeren Temperaturbereich von 20°C in der weichfesten Agarsäule in der Zwischenzeit entwickelt.

Bei den Ergebnissen im Nativpräparat und in der Pasteur'schen Pipette kam es zu weitgehender Übereinstimmung insoweit, als optimale Temperaturen für die Beweglichkeit im Bereich von 10 - 15°C nach 36-stündiger Bebrütung festgestellt werden konnten. Die Wanderungsgeschwindigkeit war zwar bei 10°C über 36 Stunden besonders kurz, aber auch im Nativpräparat hatte sich gezeigt, daß diese Temperatur noch günstig war.

Die Wanderungsgeschwindigkeit erlitt bei 20°C bei 18 Std. eine erhebliche Verlängerung. Dies stand in einem gewissen Widerspruch zu den Ergebnissen, die im Nativpräparat bei gleicher Zeit gefunden wurden, denn die Beweglichkeit war bei Untersuchungen im Nativpräparat bei 20°C während 18 Std. als gut (++) beurteilt worden.

2. Beweglichkeit von P.pseudotub. auf gewöhnlichem Nähragar, Konradi-Drigalski-Agar, in Nähr- und Traubenzuckerbouillon unter aeroben Bedingungen

Um möglichst gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden die Nährböden mit Keimen beimpft, die vorher bei 37°C während 24 Stunden bebrütet worden waren. Diese Keime benutzten wir in einer Menge von etwa einer Kolonie als Inoculum je Nährbodenplatte, wobei wir dieses mit der Platinöse in Schlangenlinien über der festen Nährbodenoberfläche ausstrichen oder in den flüssigen Nährsubstraten an der Innenwandung des Glasröhrchens zerrieben, um es dann in der Flüssigkeit zu verteilen.

Die Bebrütung aller Nährsubstrate erfolgte bei Temperaturen von +5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 37°C, die Entnah-

me der Keime zur Prüfung der Beweglichkeit im Nativpräparat (hängender Tropfen) nach 6, 18, 24, 36, 42, 56 Stunden. Bei der Prüfung auf Beweglichkeit mittels weichfesten Agar's in der Pasteur'schen Pipette wurden nur Stichproben bei Bebrütungstemperaturen bei 10°, 15° und 20°C durchgeführt, und zwar nur an Keimen, die in der Nährbouillon vermehrt worden waren.

Die Ergebnisse der Prüfung auf Beweglichkeit mit dem Nativpräparat sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Hinsichtlich der Beurteilung des Wachstums und der Beweglichkeit sei auf Tabelle 1 verwiesen. In der Tabelle 3 wurde der Grad der Beweglichkeit der Keime in Klammern eingefügt.

Tabelle 3

Prüfung des Wachstums und Beweglichkeit von P.pseudotub. auf verschiedenen festen und flüssigen Nährböden bei verschiedener Temperatur und Dauer

Temperatur	Nährmedium	Zeit in Stunden 6	18	24	36	42
5°	gew.Nähragar	-	-	-	+ (+)	
	Drigalski	-	-	-	+ (+)	
	Bouillon	-	+ (+)	+ (+)	++ (+)	
	Traubenzuckerbouillon	-	+ (+)	+ (++)	++ (++)	
10°	gew.Agar	-	-	+ (++)		
	Drigalski	-	-	+ (+)		
	Bouillon	-	-	+ (++)		
	Traubenzuckerbouillon	-	-	+(+++)		
15°	gew.Agar	-	+ (+)	++(++)	+++ (+++)	+++ (+++)
	Drigalski	-	+ (+)	++(++)	+++ (++)	+++ (++)
	Bouillon	-	+ (+)	++(++)	+++ (+)	+++ (+)
	Traubenzuckerbouillon	-	++ (++)	+++(+++)	+++ (+)	+++ (-)

Temperatur	Nährmedium	Zeit in Stunden 6	18	24	36	42
20°	gew.Agar	-	+ (++)	+++ (++)	+++ (++)	
	Drigalski	-	+ (++)	+++ (++)	+++ (++)	
	Bouillon	-	+ (++)	+++ (++)	+++ (+)	
	Traubenzuckerbouillon	+	++ (++)	+++ (+)	+++ (+)	
25°	gew.Agar	+ (+)	++ (-)	+++ (-)		
	Drigalski	+ (+)	++ (-)	+++ (-)		
	Bouillon	+ (+)	+++ (+)	+++ (-)		
	Traubenzuckerbouillon	+ (+)	+++ (-)	+++ (-)		
30°	gew. Nähragar	+ (-)	+++ (-)	+++ (-)		
	Drigalski	+ (-)	+++ (-)			
	Bouillon	++ (-)	+++ (-)			
	Traubenzuckerbouillon	++ (-)	+++ (-)			
37°	gew. Nähragar	+ (-)	+++ (-)	+++ (-)		
	Drigalski	+	+++ (-)			
	Bouillon	+	+++ (-)			
	Traubenzuckerbouillon	++	+++ (-)			
40°	gew.Nähragar	-	+ (-)	++ (-)	+++ (-)	
	Drigalski	-	+ (-)	++ (-)		
	Bouillon	-	+ (-)	++ (-)		
	Traubenzuckerbouillon	-	+ (-)	++ (-)		

Zeichenerklärung siehe Seite 16

Bei +5° bis 15°C und 6-stündiger Bebrütung war makro- und mikroskopisch ein Wachstum nicht nachweisbar.

Bei 20°C kam es nach 6 Stunden nur in der Traubenzuckerbouillon zu einer geringen Vermehrung. Die in der Bouil-

lon gezüchteten Keime waren beweglich, eine Differenzierung in geringe oder starke Beweglichkeit war nicht möglich, da die Zahl der Keime zu gering war.

Bei einer 6-stündigen Bebrütung bei 25°C war das Wachstum auf allen 4 Nährböden gering. Eine Bewegung bei einzelnen Keimen (+) war festzustellen.

Eine 18-stündige Bebrütung bei 5°C brachte in den beiden flüssigen Nährmedien ein geringes Wachstum, mit schwacher Beweglichkeit, auf den beiden Festnährböden ließen sich Wachstum und Beweglichkeit nicht feststellen.

Bei gleicher Bebrütungszeit bei 10°C waren unerklärlicherweise weder Wachstum noch Beweglichkeit nachzuweisen, eine Tatsache, die darauf hindeutet, daß die Feststellungsmethoden von Wachstum und Beweglichkeit bei Anwendung von niedriger Bebrütungstemperatur nicht in jeder Hinsicht zuverlässig waren.

Bei 15°C während 18 Stunden waren schwaches Wachstum mit schwacher Beweglichkeit auf gewöhnlichem Nähragar, Konradi-Drigalski-Agar und in gewöhnlicher Bouillon vorhanden. Traubenzuckerbouillon zeigte zu dieser Zeit mittelgradiges Wachstum und eine Beweglichkeit bei etwa 50% (++).

Die Bebrütung bei 20°C bei 18 Stunden förderte Wachstum und Beweglichkeit. Eine Erhöhung der Temperatur auf 25°C brachte eine weitere Vermehrung des Wachstums, aber, bis auf einzelne Keime in der gewöhnlichen Nährbouillon, waren die Keime unbeweglich.

Eine 24-stündige Bebrütung bei 5°C ergab deutlich geringes Wachstum in den flüssigen Nährböden und eine Beweglichkeit einzelner Keime, die sich in der Traubenzuckerbouillon bis auf 50% der Keime steigerte.

Die Bebrütung während 24 Stunden bei 10°, 18°, 20°C vermehrte Wachstum und Beweglichkeit weiterhin, wobei hervortrat, daß die Beweglichkeit der Keime in der Traubenzukkerbouillon besonders stark (+++) war.

Bei 25°C während 24 Stunden war das Wachstum nach wie vor sehr gut, es fehlte aber in allen Fällen die Beweglichkeit der Keime. Temperaturbereiche über 25°C brachten wäh-

rend einer Zeit von 6, 18, 24 Stunden starkes Wachstum, aber es fehlte in jedem Fall eine Beweglichkeit.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß der Temperaturbereich von 5° bis 20°C während 18 bis 36 Stunden auf gewöhnlichen Nähragar, Konradi-Drigalski-Agar, Nährbouillon und Traubenzuckerbouillon eine Vermehrung und eine Bewegung der Keime gewährleistet, bei 25°C ist bei kurzer Bebrütung mit einzelnen beweglichen Keimen zu rechnen, bei längerer Bebrütungsdauer und Temperaturen über 25°C bleibt eine Beweglichkeit der Keime in der Regel aus. Die optimale Temperatur zur Erlangung einer lebhaften Beweglichkeit von P.pseudotub. dürfte zwischen 15°C und 20°C liegen. Flüssige Nährböden haben einen beweglichkeitssteigernden Effekt. Traubenzuckerbouillon ist der gewöhnlichen Bouillon in Hinsicht auf die Ausbildung der Beweglichkeit geringgradig überlegen.

Die Durchwanderungsgeschwindigkeit im weichfesten Agar in der Pasteur'schen Pipette betrug bei Keimen, die bei 10°C während 36 Std. in der gewöhnlichen Nährbouillon vermehrt worden waren 7 Stunden, gleiche Zeiten wurden von Keimen erzielt, die bei 15°C während 36 Std. gezüchtet worden waren. Eine Bebrütung bei 20°C und 18 Stunden ergab eine Durchwanderung in 24 Stunden. Die Wanderungsgeschwindigkeit, bei den Temperaturen von 10° und 15°C differieren gegenüber den Geschwindigkeiten, die bei der Vermehrung der Pasteurellen auf gewöhnlichen Nähragar im vorherigen Versuch (Tabelle 2) festgestellt wurden. Diese Diskrepanz ist nach unserem Dafürhalten so zu erklären, daß bei beiden Nährbodenarten (Nähragar und Bouillon) nicht unbedingt gleiche Keimmengen zur Beimpfung verwendet wurden. Wir sind der Meinung, daß im Inoculum der bebrüteten Nährbouillon eine geringere Keimzahl als bei Nähragar vorgelegen hat.

3. pH-Wert des Nährmediums und Temperatur und ihre Auswirkungen auf die Beweglichkeit von P.pseudotuberculosis

Die Untersuchung über den Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum und die Beweglichkeit wurden in einer gewönn-

lichen Nährbouillon, die als Ausgangswert einen pH von 7,2 hatte, vorgenommen. Der pH-Wert der Bouillon wurde mit $^1/_n$ Natronlauge (NaOH) oder Salzsäure (HCl) geändert, sodaß die Keime sich bei pH-Werten von 4,5 bis 12 vermehren konnten. Mit einem pH von 4 bei 14°, 18° und 37° wurde begonnen, dann wurde der pH-Wert jeweils um 0,5 verschoben.

Die Ergebnisse der Prüfung auf Wachstum und Beweglichkeit der Keime sind in Tabelle 4 zusammengestellt:

Tabelle 4

Einfluß des pH-Wertes auf Wachstum und Beweglichkeit von P.pseudotub. bei 14°, 18°, 37° während 18, 24, 36, 42 Stunden

14°C

pH-Wert	18		24		36		42 Std.	
	W	B	W	B	W	B	W	B
4	-	-	-	-	-	-	-	-
4,5	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	++	+	+++	++	+++	+
5,5	+	+	++	++	+++	++	+++	+
6	+	+	++	++	+++	++	+++	+
6,5	+	+	++	++	+++	++	+++	+
7	+	+	++	++	+++	+++	+++	-
7,5	+	+	++	++	+++	+++	+++	+
8	+	+	++	++	+++	+++	+++	+
8,5	+	+	++	++	+++	+++	+++	+
9	+	+	++	++	+++	++	+++	+
9,5	+	-	++	+	+++	++	+++	+
10	+	-	++	+	+++	++	+++	-
10,5	-	-	++	-	+++	-	++	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
11,5	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-

18°C

pH	18		24		36		42	
	W	B	W	B	W	B	W	B
4	-	-	-	-	-	-	-	-
4,5	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
5,5	+	+	++	++	+++	+	+++	-
6	+	+	++	++	+++	+	+++	+
6,5	+	+	++	++	+++	+	+++	-
7	+	+	++	++	+++	+	+++	-
7,5	+	+	++	++	+++	+	+++	-
8	+	+	++	++	+++	+	+++	-
8,5	+	+	++	++	+++	+	+++	+
9	+	+	++	++	+++	+	+++	-
9,5	+	+	++	++	+++	+	+++	-
10	+	-	+	-	++	-	++	-
10,5	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
11,5	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-

37°C

pH	18		24		36	
	W	B	W	B	W	B
4	-	-	-	-	-	-
4,5	-	-	-	-	-	-
5	++	-	+++	-	+++	-
5,5	++	-	+++	-	+++	-
6	++	-	+++	-	+++	-
6,5	++	-	+++	-	+++	-
7	++	-	+++	-	+++	-
7,5	++	-	+++	-	+++	-
8	++	-	+++	-	+++	-
8,5	++	-	+++	-	+++	-
9	++	-	+++	-	+++	-
9,5	++	-	++	-	+++	-
10	-	-	-	-	+	-
10,5	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
11,5	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung siehe Seite 16

Bei Bebrütung bei 14°C und einem pH von 4,0 und 4,5 konnten

weder Wachstum noch Beweglichkeit der Keime nach 18 bis 42 Stunden festgestellt werden.

Eine schwache Vermehrung war bei einem pH von 5,0 nach 18, 24, 42 Std. festzustellen, wobei sich eine schwache Beweglichkeit der Keime nach 24-stündiger Bebrütung zeigte.

Die Erhöhung des pH-Wertes um 0,5 brachte bei 14°C während einer Bebrütung von 18 bis 42 Stunden eine Zunahme des Wachstums und der Beweglichkeit. Sie war besonders stark nach 24 Stunden ausgeprägt. Ein optimales Wachstum und der Beweglichkeit zeichnete sich bei 14°C in einem pH-Bereich von 5,5 bis 8,5 bei 36 Stunden ab.

Bei dem pH-Bereich von 10 und höher nahm das Wachstum deutlich ab und war eine Beweglichkeit nur noch nach 24 bis 36 Stunden nachweisbar.

Bei einem pH-Wert von 11 und höher blieb ein Wachstum aus.

Die Bebrütung bei 18°C ergab bei einem pH von 4,0 - 5,0 über einen Zeitraum von 42 Std. kein Wachstum.

Ein schwaches Wachstum mit geringer Beweglichkeit lag in einem pH-Bereich von 5,5 bis 9,5 bei 18°C und 18 Stunden vor. Mit zunehmender Zeit verstärkte sich das Wachstum,während die Beweglichkeit nur bis nach 24 Stunden zunahm, um danach langsam abzufallen.

Bei einem pH von 10 ist sehr spärliches Wachstum ohne bewegliche Keime erkennbar, während bei noch höheren pH-Bereichen das Wachstum ausblieb.

Bei 37°C wurde in den pH-Bereichen von 4,0 - 4,5 und 10,0 bis 12,0 kein Wachstum der Pasteurellen beobachtet,während es in den dazwischenliegenden Werten (5,0 bis 9,5) nach 18 Stunden als gut bezeichnet werden konnte. Mit Verlängerung der Bebrütungszeit nahm es an Stärke zu, wobei bewegliche Keime fehlten.

Die Versuchsreihe zeigt, daß die Beweglichkeit von P.pseudotub. bei einem pH-Bereich von 5,0-10,0 bei einer Bebrütungstemperatur von 14°C vorhanden ist, daß jedoch der pH-Bereich von 5,5-9,0 bei 14°C nach 24- und 36-stündiger Bebrütung für die Beweglichkeit am günstigsten ist.

Bei 18°C ist der pH-Bereich von 5,5-9,5 nach 24-stündiger Bebrütung für die Beweglichkeit besonders günstig, nach 36-stündiger Bebrütung läßt die Beweglichkeit nach. Bei 37°C ist in keinem pH-Bereich eine Beweglichkeit nachzuweisen.

4. Einflüsse von Kohlehydraten in gewöhnlicher Nährbouillon auf das Wachstum und in der Beweglichkeit von P. pseudotub.

Die Versuche wurden mit 4 Kohlehydraten Dextrose, Maltose, Laktose, Saccharose durchgeführt. Diese Kohlehydrate wurden der Nährbouillon in einer Menge von 1 und 2% hinzugefügt. Die Bebrütung der beimpften Bouillon erfolgte bei 14°, 18° und 37°C, während 18, 24, 36, 42 Stunden.

Die Ergebnisse der Prüfung auf Wachstum und Beweglichkeit sind in Tabelle 5 übersichtlich dargestellt.

Tabelle 5

Prüfung des Wachstums und der Beweglichkeit nach Vermehrung in gewöhnlicher Nährbouillon mit 1 und 2% Dextrose, Laktose, Saccharose und Maltose bei Temperaturen von 14°, 18° und 37°C und 18, 24, 36, 42 Stunden

	Kohlehydrat	%	18		24		36		42 Std.	
			W	B	W	B	W	B	W	B
14°C	Glukose	1	+++	++	+++	++	+++	+	+++	-
		2	++	+	+++	++	+++	+	+++	-
	Laktose	1	++	+	+++	++	+++	-	+++	-
		2	++	+	+++	++	+++	+	+++	-
	Saccha.	1	++	+	+++	+	+++	-	+++	-
		2	++	+	+++	+	+++	+	+++	-
	Maltose	1	+++	+	+++	+	+++	-	+++	-
		2	+++	+	+++	+	+++	-	+++	-
18°C	Glukose	1	+++	++	+++	+	+++	-		
		2	+++	+	+++	+	+++	-		
	Laktose	1	+++	++	+++	+	+++	-		
		2	++	+	+++	+	+++	-		
	Saccha.	1	+++	++	+++	+	+++	-		
		2	+++	+	+++	-	+++	-		
	Maltose	1	+++	++	+++	+	+++	-		
		2	+++	+	+++	-	+++	-		
37°C	Glukose	1	+++	-	+++	-				
		2	+++	-	+++	-				
	Laktose	1	+++	-	+++	-				
		2	+++	-	+++	-				
	Saccha.	1	+++	-	+++	-				
		2	+++	-	+++	-				
	Maltose	1	+++	-	+++	-				
		2	+++	-	+++	-				

Nur das Optimum an Wachstum und Beweglichkeit interessierte. Deshalb wurden ausschließlich die Temperaturbereiche von 14° und 18°C und zum Vergleich 37°C genommen.

Als einzige Kohlehydrate, die auf die Beweglichkeit einen günstigen Einfluß zu haben schienen, kamen Glukose und Laktose in Betracht. Der Einfluß dieser Kohlehydrate war nach einer 24-stündigen Bebrütung besonders deutlich. Das zeigte sich bei 18- und 24-stündiger Bebrütung.

Bei 36- und 42-stündiger Bebrütung war das Wachstum noch sehr gut, jedoch ließ die Beweglichkeit nach 36 Stunden nach und sie war nach 42-stündiger Bebrütung aufgehoben.

Bei 1 und 2% Laktose war kein Unterschied festzustellen. Saccharose und Maltose förderten das Wachstum deutlich, blieben aber für die Beweglichkeit ohne erkennbaren Einfluß.

Die Bebrütung bei 18°C erzielte schon nach 18-stündiger Bebrütung reichliches Wachstum mit mittelgradiger Beweglichkeit bei einem Zusatz von 1% Dextrose, Laktose, Saccharose und Maltose. Zusätze von diesen Kohlehydraten in 2%iger Form schienen die Beweglichkeit nicht erheblich zu fördern. Nach 24 Stunden Bebrütung ging die Beweglichkeit zurück und war nach 36 Stunden aufgehoben.

Die Bebrütung bei 37°C hatte bei einer Zeit von 18-24 Stunden einen günstigen Einfluß auf das Wachstum bei allen Kohlehydratzusätzen. Doch war eine Beweglichkeit der Keime in keinem Fall festzustellen.

Aus den Versuchsergebnissen möchten wir den Schluß ziehen, daß begünstigende Faktoren für die Beweglichkeit durch Zusatz von Kohlehydraten nicht erwartet werden können. Bei Dextrose- und Laktosezusatz kann ein geringer fördernder Einfluß für die Beweglichkeit eintreten, wenn die Bebrütung bei 14°C nicht länger als 24 Stunden dauert.

5. Wachstum und Beweglichkeit von P.pseudotub. bei Vermehrung unter anaeroben Bedingungen und im mikroaerophilen Milieu (10% CO_2) bei 5,10,15,20,25,30 und 37°C während 6,18,24,36 und 42 Stunden

Für die Vermehrung von P.pseudotub. unter anaeroben Bedingungen wurde die Bierfilzmethode nach Ott mit Pyrogallol ($C_6H_3(OH)_3$) und Pottasche (K_2CO_3) benutzt. Die Methode hat sich im Institut bei der Züchtung anaerober Keime sehr bewährt und bietet nach unseren Erfahrungen weitgehende Sicherheiten für eine Anaerobiose. Als Nährboden wurden Frischblutagarplatten verwendet.

Zur Schaffung eines mikroaerophilen Milieus wurden die beimpften Nähragarplatten in einen Exsiccator gebracht. Nach Schließen des Deckels mittels Vakuumfettes wurden 300 cm^3 Kohlendioxyd in den Exsiccator eingeleitet, dessen Luftraum ca. 3 Liter betrug. Durch kurzes Öffnen des Hahnes wurde ein Druckausgleich herbeigeführt. Der Exsiccator wurde mit den Platten in den Klimaschrank gestellt, und unter Einhaltung der in Tabelle 6 aufgeführten Temperaturen und Zeiten bebrütet.

Tabelle 6

Wachstum und Beweglichkeit von P.pseudotub. bei anaeroben Bedingungen und im mikroaerophilen Milieu bei Temperaturen von 5°bis 37°C nach 6,18,24,36,42 Stunden

Temperatur	Bebrütungsmilieu	Bebrütungsdauer in Std.: 6	18	24	36	42
5°C	anaerobes M.	-	-	-	-	-
	mikroaerobes Milieu	-	-	-	-	+ (-)
10°C	anaerobes M.	-	-	-	-	+
	mikroaerobes Milieu	-	-	-	-	+

Temperatur	Bebrütungsmilieu	Bebrütungsdauer in Std.: 6	18	24	36	42
15°C	anaerobes M.	-	-	+ (+)	+ (+)	+ (+)
	mikroaerob.M.	-	-	+ (+)	++(++)	++(++)
20°C	anaerobes M.	-	-	+ (+)	++(+)	++(-)
	mikroaerob.M.	-	-	++(++)	++(++)	+++(+)
25°C	anaerobes M.	-	+ (+)	++(-)	++(-)	+++(-)
	mikroaerob.M.	-	+ (++)	+++ (++)	+++(++)	+++(-)
30°C	anaerobes M.	-	+ (-)	++ (-)	+++(-)	
	mikroaerob.M.	+ (-)	++(+)	+++(+)	+++(-)	
37°C	anaerobes M.	-	+ (-)	++ (-)	+++(-)	
	mikroaerob.M.	+ (-)	++(+)	+++(+)	+(+)	

Zeichenerklärung siehe Seite 16

Die Kultivierung unter anaeroben Bedingungen hemmte das Wachstum von P.pseudotub. geringgradig und hatte keinen fördernden Einfluß auf die Beweglichkeit der Keime, selbst bei Bebrütung bei 15° und 20°C während 24 und 36 Stunden.

Hingegen waren das Wachstum und die Beweglichkeit bei Bebrütung im mikroaerophilen Milieu gut und mit den Ergebnissen bei Züchtung unter normalen atmosphärischen Bedingungen vergleichbar.

Das Optimum an Wachstum und Beweglichkeit lag im mikroaerophilen Milieu bei etwa 20°C und einer Bebrütungsdauer von 24 bis 36 Stunden.

Bemerkenswert ist, daß nach Bebrütung bei 30° und 37°C nach 18, 24 und 36 Stunden im mikroaerophilen Milieu noch einzelne bewegliche Keime (+) nachgewiesen werden konnten.

Abschnitt II

Technische Vorbemerkungen und Literatur

Elektronenmikroskopische Untersuchungen sollten zur Ergänzung der lichtmikroskopischen Befunde an dem Chinchilla-Stamm der Past.pseudotub. durchgeführt werden. Dabei war insbesondere die Frage abzuklären, ob zwischen dem Grad der lichtmikroskopisch festgestellten Beweglichkeit und der Zahl oder der elektronenmikroskopisch festgestellten Geißeln eine Relation bestand, wie die Geißeln aussahen und wo sie ihre Ansatzpunkte hatten.

Eine Durchsicht der einschlägigen Literatur ergab, daß bis heute unseres Wissens elektronenmikroskopische Aufnahmen von Past.pseudotub. noch nicht vorliegen.

Ehe elektronenmikroskopische Untersuchungen in Angriff genommen wurden, hatten wir die Geißeldarstellung nach Löffler und die Versilberung nach Sous (Techniken siehe Hallmann (7)) im Lichtmikroskop durchgeführt. Es gelang uns dabei wohl Geißeln sichtbar zu machen, aber die Bilder befriedigten wenig, zumal stark bewegliche Keime nur vereinzelt Geißeln aufwiesen und die Zuordnung dieser zu den einzelnen Stäbchen nicht zweifelsfrei möglich war.

Wir bedienten uns bei der Präparation für das Elektronenmikroskop der "Negativ Staining"-Methode.

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Erregern benutzt man entweder das "Positiv Staining" oder in den letzten Jahren im zunehmenden Maße das "Negativ Staining". Das "Negativ Staining" von Brenner und Horne (3) (1959) inauguriert, wurde zunächst für die Virusdarstellung benutzt, wobei die Objektumgebung mit Hilfe von Schwermetallen derart beschichtet wurde, daß das Objekt als heller Bezirk während der Durchstrahlung ausgespart blieb. Als Kontrastierungsmittel wurden Kalium- und Natrium-Phosphorwolframsäure, Natrium-Phosphormolydate, Uranylacetat, Uranylnitrat, Lanthiumacetat, Thoriumnitrat und -chlorid (Bradley (2)) verwendet. Neben dem Uranylacetat war es vor allem die Phosphorwolframsäure (= PWS), die informative Untersu-

chungen ermöglicht (Bradley) und von Mach (14), Thornley und Horne (24) benutzt wurde. Die Länge der Einwirkungszeit, die Konzentration der Salzlösung sowie die Art des Lösungsmittels (Wasser, Alkohol) führten eventuell dazu, daß das Kontrastierungsmittel nicht nur auf der Oberfläche abgelagert wurde, sondern auch, wie Peters, Müller und Geister (17) an einem Vaccine-Virus zeigen konnten, in das Objekt eindringen konnte.

Wurde die PWS in einer wäßrigen Lösung angewendet, so behielten nach Thornley und Horne (24) Keime ihre Beweglichkeit und ihre Überlebensfähigkeit über längere Zeit. Die Auflösung war gegenüber dem "Positiv Staining" nicht vermindert (nach Stouthamer, Daems und Eigner (21)). Virusarten konnten in ihren Größen mit einer Genauigkeit von 150 bzw. 210Å gemessen werden (Brenner und Horne (3)). Auch ließen sich Phagenfortsätze mit Dicken von 45 bis 50Å (Mach (14)) oder Fimbriemunterschiede zwischen 43 und 71Å (Thornley und Horne (24)) feststellen.

Bei Bakterien ist das "Negativ Staining" besonders für die Darstellung der Zelloberfläche herangezogen worden. Geißeln, die als Bewegungsorganellen an der Oberfläche ansetzen, lassen sich daher mit dem "Negativ Staining" besser als mit dem Bedampfungsverfahren (Fuhs und Seeliger (5)) darstellen. Hartwigk und Grund (8) bedienten sich des Filmbewuchsverfahrens und wiesen darauf hin, daß die ursprüngliche Lagebeziehung von Geißel und Bakterienzelle eine besondere Beachtung finden sollte.

Für die Untersuchung der Geißelfeinststrukturen erwies sich das Uranylacetat als geeignet (Lowy und Hanson (13)), aber da die PWS eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 ermöglichte, glaubten wir, mit dieser Substanz die Begeißelung wesentlich besser quantitativ erfassen zu können.

In der Tat bewährte sich die PWS für die Kontrastierung, und sie wurde bevorzugt verwendet.

Methodik

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Elektronenmikroskop der Firma Siemens und Halske (Elmiskop I) der elektronenmikroskopischen Abteilung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität durchgeführt.

Als Objektträger dienten Gitternetzblenden der Firma Frey, die eine freie Fläche von $50\mu^2$ aufwiesen. Diese wurden mit einer Trägerfolie versehen, die nach Bradley (2) durch Verdampfung von Kohle im Vacuum auf Kollodium befilmte Glasobjektträger erzeugt wurde. Der Trägerfilm wurde später abgeschwemmt und auf die Gitternetzblenden übertragen, wie es Dowell (4) beschrieben hat.

Nach Filtration wurden 2 Tropfen der frischhergestellten PWS-Lösung auf eine Einzelkolonie aufgesetzt. Mit einer Kapillare wurde die entstandene Aufschwemmung nach ca. 1 Minute aufgenommen und auf die Gitternetzblenden verbracht.

Wichtig war dabei, daß die Keime isoliert und in einem ausreichenden Abstand voneinander auf der Blende präpariert wurden, damit die Geißeln über ihre gesamte Länge beobachtet und dem Keim zugeordnet werden konnten. Die Verteilung der Bakterien war abhängig von der Koloniegröße, dem PWS-Tropfen sowie der Beweglichkeit der Pasteurellen. Unbewegliche Keime mußten erst mit Hilfe eines Glasfadens aufgewirbelt werden. Durch wiederholten Wechsel der PWS auf der Blende konnten nicht nur die aus dem Nährmedium stammenden Begleitsubstanzen entfernt, sondern auch die günstigste Bakterienkonzentration unter lichtmikroskopischer Kontrolle ermittelt werden.

Der Kontrast war bei der gewählten Technik von der aufgelagerten Menge bzw. der Dicke der PWS-Schicht abhängig und durch die Größe des letzten PWS-Tropfens auf der Blende einstellbar.

Nach Eintrocknung wurden die Präparate ohne Zeitverlust in das Elmiskop eingeschleust, um Abbrüche oder Tren-

nungen der Geißeln von den Bakterienkörpern sowie Verschmutzungen oder sekundäre unkontrollierbare Präparatveränderungen möglichst zu vermeiden.

Ergebnisse

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen dienten erstens unbewegliche Keime (Bebrütung 24 Stunden bei 37°C), zweitens mittelgradig bewegliche Keime (Bebrütung 24 Stunden bei 20°C) und drittens optimal bewegliche Pasteurellen (Bebrütung 36 Stunden bei 15°C), wobei durch lichtmikroskopische Kriterien die einzelnen Kulturen überprüft und ausgewählt wurden.

Nach Bebrütung bei 37°C sind, wie Abbildung 2 zeigt, Keime zu erkennen, die eine Länge von 2,1µ aufweisen. Längere Geißeln fehlen, zuweilen wurden kurze Geißelstummel beobachtet (siehe Abbildung 11). Bei 100 Keimen waren etwa 10 Geißelstummel erkennbar, woraus wohl geschlossen werden kann, daß die Geißelstummel als Ausdruck einer gehemmten Geißelausbildung gewertet werden können. Bei optimalen Keimwachstumsbedingungen, die durch die Größe und das Vorhandensein zahlreicher Teilungsformen gekennzeichnet waren, konnte die Unbeweglichkeit eindeutig auf das Fehlen der Geißelbildung zurückgeführt werden.

Bei Bebrütung bei 20°C wurden an 100 Keimen 94 Geißeln ermittelt. Meist wiesen die Keime eine Geißel auf, die entweder im polaren Bereich oder in der Mitte des Keimes ihren Ursprung hatte (Aufnahme 7,8). Nur selten wurden 2 Geißeln an einem Stäbchen gesehen. Die Keime hatten eine Länge von 1,2µ, während die Geißeln 2,6µ lang waren. Geißelstummel wurden nicht beobachtet.

An maximal beweglichen Keimen aus 36 Stunden alten, bei 15°C bebrüteten Kulturen, trat eine bemerkenswerte Variation der Geißelzahl und der Form in Erscheinung, wobei auf 100 Keime 90 Geißeln kamen (Aufnahme 1). Die Gesamtzahl der Geißeln, die an 100 Keimen festgestellt wurde, war also bei Keimen, die bei 20°und 15°C bebrütet worden waren, etwa die gleiche und gab keine Erklärung dafür, daß die bei 15°C gezüchteten Keime im Nativpräparat beweglicher als die bei 20°C bebrüteten waren. Die Geißeln hatten einen spiraligen (Aufnahme 4,5) oder leicht gewellten Verlauf (Aufnahme 3,4)

oder sie waren ringförmig (Aufnahme 9,10). Unter den 1,2µ großen bei 15°C bebrüteten Keimen fielen kleine Keime (0,6µ) auf, an denen oft bis zu 4 Geißeln festgestellt werden konnten (Aufnahme 3). Die Geißeln waren in diesen Fällen ebenfalls 2,8µ lang und in ihren Ursprüngen über die gesamte Oberfläche verteilt, während bei längeren Stäbchen die Geißeln bevorzugt an den Keimenden ansetzten. Die Geißeln bildeten sich offenbar nicht auf einmal, sondern entstanden nacheinander (Aufnahme 5,6 - Pfeile). An bereits begeißelten Keimen wurden gelegentlich kurze Geißeln beobachtet, die vielleicht Entwicklungsformen der Geißeln sind. Bei Bebrütungstemperaturen von 15°C sind oft auch Kleinstformen der Pasteurellen, die stets unbegeißelt sind, (Aufnahme 4,6 Pfeil) zu finden. Sie können möglicherweise mit den von Grund (6) beschriebenen Kleinformen der Brucellen verglichen werden.

In optimal beweglichen Kulturen waren Keime zu finden, die in Größe und Geißelzahl denen aus Kulturen von 20°C entsprachen. Daneben kamen aber auch Keime vor, die eine geringe Größe und mehrere Geißeln aufwiesen. Geringe Oberfläche und 4 Geißeln konnten als die morphologischen Merkmale der Pasteurellenform mit stärkster Beweglichkeit gelten. Ihr Auftreten ist für die Kultivierung bei 15°C charakteristisch. Demnach war für den Beweglichkeitsgrad neben der Geißelaktivität und dem Verhältnis von begeißelten zu unbegeißelten Keimen, insbesondere der Prozentsatz von Keimen mit geringer Oberfläche und mehreren Geißeln maßgebend.

Im folgenden sei kurz über die elektronenmikroskopischen Aufnahmen einzelner besonders charakteristischer Keime von P. pseudotub. berichtet.

Bild 1

Begeißelte Keime von Past.pseudotub., 36 Stunden lang bei 15°C auf gewöhnlichem Nähragar bebrütet. Zahl der Geißeln bei den einzelnen Keimen unterschiedlich. 2 Keime in der Teilung, 1 Keim mit 3 Geißeln.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr.1,7x

Bild 2

Past.pseudotub. von gewöhnlichem Nähragar, 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Alle Keime ohne Geißeln. Keime deutlich größer als in Aufnahme 1.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr.1,7x

Bild 3

Kleiner Keim (0,6µ) ohne Teilungszeichen. Kultivierung auf gewöhnlichem Nähragar bei 15°C 36 Stunden lang. 4 Geißeln sichtbar, ihre Länge beträgt 2,8µ.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr.1,7x

Bild 4

Begeißelter Keim aus einer 36-stündigen Kultur, die bei 15°C bebrütet worden war. Großer Keim mit zwei Geißeln. Daneben Kleinstkeim ohne Geißeln.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr.1,7x

Bild 5

Zwei dichtaneinander liegende Keime mit je einer Geißel, die verschlungen sind. An einem Keim sind kurze Geißeln zu erkennen (siehe Pfeile!). Keime wurden 36 Stunden auf gewöhnlichem Nähragar mit 15°C bebrütet.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr.1,7x

Bild 6

In Teilung befindlicher Keim von Past.pseudotub. 4 Geißeln sind gut ausgebildet, daneben treten Geißelstummel auf (s.Pfeile!). Ein unbegeißelter Kleinstkeim rechts im Bild sichtbar. Kultivierung bei 15°C über 36 Stunden.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr.1,7x

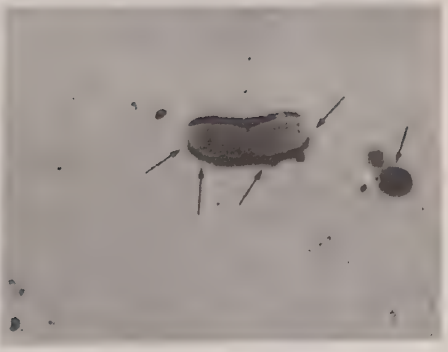


Bild 7 und 8

Zwei Keime aus einer 20°C-Kultur von gewöhnlichem Nähragar, 24 Stunden alt. Beide Keime besitzen nur je eine Geißel, der untere Keim befindet sich in 2 Teilungsstadien.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr. 1,7x

Bild 9

Keim mit 4 reifenförmigen Geißeln. Bebrütung auf gewöhnlichem Nähragar 36 Stunden lang bei 15°C.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr. 1,7x

Bild 10

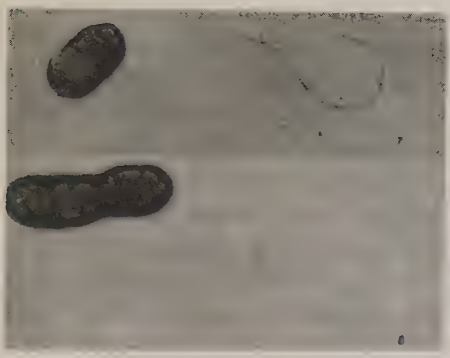
Keim mit drei spiraligen Geißeln im Zustande der Teilung. Kultivierung bei 15°C über 36 Stunden auf gewöhnlichem Nähragar.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr. 1,7x

Bild 11

Bei 37°C auf gewöhnlichem Nähragar gezüchteter Keim, 24 Stunden alt. Eine kurze Geißel (Geißelstummel) vorhanden. Beginn einer Teilung erkennbar.

Vergrößerung 1:8000, Nachvergr. 1,7x



Besprechung

Mit den Faktoren, die die Beweglichkeit von P.pseudotub.beeinflussen, hat sich vor allem Weitzenberg (25) beschäftigt. Der Autor sprach den bei der Bebrütung der Keime angewendeten Temperaturen und der Bebrütungsdauer für die Beweglichkeit die größte Bedeutung zu. Der Temperaturbereich von 8°- 15°C während 18 - 48 Stunden erwies sich dabei als optimal, bei Temperaturen von +3 und +8°C entwickelten sich bei gleicher Dauer keine beweglicheren Keime. Bei Temperaturen von 37°C waren die Keime unbeweglich, sie konnten aber eine schwache Beweglichkeit wieder erlangen, wenn sie nach Bebrütung bei 37° bei 20°C aufbewahrt wurden.

Tierpassagen, Kohlehydrate oder Glycerinzusätze zum Nährmedium förderten die Beweglichkeit nach Weitzenberg nicht. Ebenso blieb ein Serumzusatz oder eine Bebrütung der Kultur unter anaeroben Bedingungen ohne Einfluß auf die Beweglichkeit.

Nach Haupt (9) ist als Optimum für die Ausbildung der Beweglichkeit der pH-Bereich 6,0 - 8,0 bei Temperaturen von 18°- 22°C anzusehen. Für Primärkulturen empfiehlt der Autor die Bebrütung bei 20° und 30°C vorzunehmen. Temperaturen von 37°C sollen nach Haupt die Entstehung von R-Formen begünstigen und unbewegliche Keime entstehen lassen. Mit dem Vorkommen von 2 - 6 Geißeln an einem einzelnen Stäbchen ist nach Haupt bei beweglichen Keimen zu rechnen.

Preston und Maitland (18) fanden bewegliche Keime bei 22°C und unbewegliche bei 37°C. Die Beweglichkeit geht nach diesen Autoren bei 30°C verloren. Ein Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Beweglichkeit wurde nicht nachgewiesen.

Nach Seeliger (20) übt die Bebrütung bei 20°C den günstigsten Einfluß auf die Ausbildung der Beweglichkeit bei Listerien aus und schränkt eine Bebrütung bei 37°C die Beweglichkeit stark ein.

Eigene Untersuchungen, die an einem Chinchilla-Stamm von P.pseudotub. (Typ I nach Kauffmann) durchgeführt wurden, ergaben auf gewöhnlichem Nähragar, daß den bei der

Bebrütung angewendeten Temperaturen und ihrer Dauer für die Ausbildung der Beweglichkeit eine Bedeutung zukommt. Die Stärke des Wachstums ging nicht mit dem Grad der Beweglichkeit parallel.

Die Beweglichkeit wurde direkt durch lichtmikroskopische Untersuchungen im Nativpräparat und indirekt durch die Wanderungsgeschwindigkeit durch eine weichfeste Agarsäule in einer Pasteur'schen Pipette kontrolliert. Aufgrund des Direktverfahrens war die Beweglichkeit der Keime am besten ausgebildet, wenn die beimpften Nähragarplatten 36 Stunden bei 15°C bebrütet wurden. Nach dem indirekten Verfahren mit der Pasteur'schen Pipette lag das Optimum bei gleicher Bebrütungszeit etwas tiefer, nämlich bei 10°C. Wesentliche Unterschiede ergaben sich bei Verwendung verschiedener Nährbodenarten (gewöhnlicher Nähragar, Konradi-Drigalski-Agar, gewöhnliche Bouillon und Traubenzuckerbouillon) nicht. Doch ließ sich feststellen, daß die Beweglichkeit in flüssigen Nährmedien etwas früher in Erscheinung trat als auf festen. Traubenzuckerbouillon schien insofern einen günstigen Einfluß zu haben, als die Beweglichkeit bei niederen Temperaturen um eine Beurteilungsstufe besser ausgebildet war als in gewöhnlicher Nährbouillon. Allerdings war die Beweglichkeit in der Traubenzuckerbouillon bei verlängerter Bebrütungszeit (42 Stunden) eher aufgehoben als in gewöhnlicher Bouillon. Wir vermuten, daß in diesem Falle die zunehmende Säurebildung die Beweglichkeit der Keime einschränkte.

Der pH-Wert hatte in der gewöhnlichen Bouillon im Bereich von 5,5 bis 9,0 weder einen fördernden noch einen hemmenden Einfluß auf die Beweglichkeit. PH-Werte von 4,0 bis 5,0 jedoch hoben das Wachstum auf. Werte von 9,5 und 10,0 ergaben keine Beweglichkeit nach 18 Stunden bei 14°C trotz schwachen Wachstums. Wurde die Bebrütungszeit verlängert (24-48 Stunden), traten bewegliche Keime in Erscheinung. Unbeweglich hingegen blieben alle Keime auf Nährmedien, die einen pH-Wert von 10,5 hatten. Im Bereich von 11 - 12,0 blieb eine Vermehrung der Keime aus. Für andere Temperaturbereiche unterschied sich der Einfluß des

pH-Wertes auf die Beweglichkeit nur geringgradig von den vorstehend geschilderten Ergebnissen.

Glukose und Laktose schienen die Stärke der Beweglichkeit in geringem Maße zu fördern. Saccharose und Maltose blieben ohne Wirkung.

Anaerobe Bedingungen verzögerten das Wachstum von P. pseudotub., verhinderten aber nicht die Ausbildung einer schwachen Beweglichkeit bei Temperaturen von 5° bis 25°C. Bei einer Bebrütung im mikroaerophilen Milieu (10% CO_2) wurden etwa die gleichen Ergebnisse wie mit der Kultur unter normalen atmosphärischen Bedingungen erzielt.

Die mit der direkten und der indirekten Prüfungsmethode erlangten Ergebnisse wurden grundsätzlich durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten Geißeln bei Keimen, die bei Temperaturen zwischen 14° und 25°C bis zu 36 Stunden lang gezüchtet worden waren und sich bei Prüfung im Hellfeldmikroskop als beweglich erwiesen. Sobald die Bebrütung bei 37°C erfolgte, wurden im Elektronenmikroskop nur noch unbegeißelte Keime, die höchstens Geißelstummel aufwiesen, festgestellt. Bei Präparation im "Negativ Staining" erschienen diese Keime größer und zeigten häufiger Teilungsformen als die bei niederen Temperaturen vermehrten Keime. Bei den beweglichen Bakterien fielen die im Vergleich zum Bakterienkörper beträchtlichen Geißellängen auf. Oft betrugen sie das 4 bis 5fache der Bakterienlängen. Die Zuordnung der Geißeln zu einzeln liegenden Stäbchen war durchweg möglich. Sie mußte aber bei sich teilenden Bakterien oder zu dicht lagernden Keimen unterbleiben.

Bei mehreren Geißeln schien eine peritriche Begeißelung vorzuliegen. Einzelne Geißeln wurden dagegen am häufigsten im polaren Teil und zwar besonders eindeutig bei längeren Stäbchen beobachtet.

Die Begeißelung der Keime aus gleicher Kolonie ist nicht einheitlich. Im Gegensatz zu den unbegeißelten Keimen der unbeweglichen Kultur (37°C) waren nach einer Bebrütung bei 15°C neben einer geringen Zahl unbegeißelter Keime vor allem eine Variabilität von Bakteriengröße und Geißelzahl

vorhanden. Während die größeren Keime der 15°C-Kultur überwiegend eine Geißel und nur vereinzelt zwei Geißeln aufwiesen, waren kleinere Keime oft mit mehreren Geißeln ausgestattet. Diese Kleinformen traten bei 20°C-Kulturen nicht auf. In mittelgradig beweglichen Kulturen, die bei 20°C bebrütet worden waren, kamen selten Keime mit mehr als einer Geißel vor. Die meisten Keime waren größer und unbegeißelt. Die Beweglichkeit einer Kultur beruht demnach auf der Beweglichkeit ihrer einzelnen Keime. Dabei ist nicht der Begeißelungsgrad aller Bakterien der Population wichtig,sondern die Ausstattung einzelner Keime mit unterschiedlicher Geißelzahl. In gut beweglichen Kulturen können durchaus auch Keime, die unbegeißelt sind, vorkommen. Je höher der Anteil an Keimen mit kleiner Oberfläche und maximaler Geißelzahl ist, umso beweglicher sind die Pasteurellen, so daß diese Pasteurellenform für stark bewegliche Kulturen, die bei 15°C bebrütet worden sind, charakteristisch ist. Vielleicht deuten die in diesen Kulturen beobachteten Spiralformen der Geißeln auf eine höhere Aktivität der Bewegungsorganellen hin. Bemerkenswert ist, daß die Beweglichkeit nicht schon am Anfang der Kultivierung bei 15°C vorhanden war, sondern sich erst im Laufe der Bebrütung ausbildete und nach 36 Stunden ihren Höhepunkt erreichte.Enzymsysteme können durch niedere Temperaturen quantitativ und z.T. auch qualitativ verändert werden. Verringerte Keimgröße, insbesondere die Kombination einer kleinen Bakterienoberfläche mit mehreren Geißeln, sowie das Auftreten von Kleinstformen, die Brucellenkleinstformen vergleichbar sind, deuten darauf hin, daß eine maximale Begeißelung Ausdruck und Folge einer Hemmung bestimmter Stoffwechselvorgänge ist, wobei die Beweglichkeit den Pasteurellen die Möglichkeit bieten könnte, den Ort eines nährstoffarmen Angebotes oder einer Anhäufung von Stoffwechselendprodukten im Sinne einer positiven oder negativen Chemotaxis zu verändern. Der Temperatureinfluß wird somit nicht direkt, sondern über die Regelung des Stoffwechselzustandes wirksam.

Um den Einfluß des Nährstoffangebotes auf die Ausbildung der Beweglichkeit zu ermitteln, wurden einfache definierte synthetische Nährmedien verwendet. Die Pasteurellen wurden auf diesem Nährsubstrat bestehend aus Kochsalz, Ammoniumphosphat, Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Asparaginsäure, Traubenzucker, Wasser und Agar bei 16°, 20° und 37°C über vier Tage vermehrt, so daß ein Wachstum erfolgte. Bewegliche Keime wurden in diesen Kulturen in keinem Falle beobachtet. Selbst bewegliche Keime, die in das Nährmedium überimpft wurden, verloren ihre Beweglichkeit nach einem Tage vollständig. Durch Änderungen der Glukose- und Ionenkonzentration (Na, K,Fe,Mg, Ca) konnten wir mit Temperatureinflüssen keine Beweglichkeit erzielen, wobei auch elektronenmikroskopisch keine Geißeln nachzuweisen waren. Wir möchten dem Gehalt an wichtigen Nährstoffen (Eiweiß) die größte Bedeutung für die Geißelbildung beimessen, so daß nicht der Temperatureinfluß allein, sondern der Stoffwechselzustand für die Ausbildung der Beweglichkeit bestimmend ist.

Zusammenfassung

1. Bebrütungstemperatur und Nährstoffangebot im Nährsubstrat sind für die Beweglichkeit von Pasteurella pseudotuberculosis und für die Ausbildung von Geißeln entscheidend. Auf Minimalnährböden kommt es zu einem Wachstum, aber es bleibt eine Beweglichkeit selbst bei für die Geißelbildung günstigen Temperaturen aus. Bei dem Nährstoffangebot dürften die eiweißhaltigen Substanzen für die Entstehung von Geißeln besonders wichtig sein.

2. Die Ergebnisse der Prüfungen auf Beweglichkeit im Nativpräparat (hängender Tropfen) mittels Wanderungsgeschwindigkeit durch eine weichfeste Agarsäule (Pasteur'sche Pipette) und durch den direkten Geißelnachweis mit dem Elektronenmikroskop (Negativ Staining-Methode) zeigten eine große Übereinstimmung.

3. Bebrütungstemperaturen von 15°C während 36 Stunden ergaben auf gewöhnlichem Nähragar eine optimale Beweglichkeit. Bei der Prüfung im Durchwanderungsverfahren (Pasteur'sche Pipette) lag das Optimum für die Beweglichkeit bei 10°C über 36 Stunden. Bei Temperaturen von 37°C waren in beiden Verfahren nur unbewegliche Keime festzustellen.

4. Als fester Nährboden erzielte der Konradi-Drigalski-Agar die gleichen Beweglichkeitsgrade wie ein gewöhnlicher Nähragar. Flüssige Nährböden (gewöhnliche Nährbouillon, Traubenzuckerbouillon) zeigten gegenüber den Festnährböden die Beweglichkeit meist um eine Beurteilungsstufe früher an.

5. PH-Werte zwischen 5,5 und 9,0 hatten in der gewöhnlichen Nährbouillon weder einen fördernden noch einen hemmenden Einfluß auf die Beweglichkeit von P.pseudotub. In den pH-Bereichen 9,5 - 10,5 und 5,0 war das Wachstum verzögert und die Beweglichkeit unterdrückt. Im stark sauren bzw. alkalischen Milieu blieb das Wachstum aus.

6. Kohlehydrate (Glukose, Laktose, Saccharose und Maltose) förderten in einer Menge von 1 oder 2% in gewöhnlicher Nährbouillon die Beweglichkeit nicht erheblich. Doch schienen Glukose und Laktose die Beweglichkeit geringgradig zu verstärken.

7. Mit einer Bebrütung beimpfter Nährmedien unter mikroaerophilen Bedingungen wurden hinsichtlich der Beweglichkeit keine besseren Ergebnisse erzielt als mit einer Bebrütung unter aeroben Verhältnissen. Eine Anaerobiose hemmte das Wachstum von P. pseudotub.

8. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an beweglichen Keimen Geißeln in unterschiedlicher Zahl (1 - 4 Geißeln) gefunden. Es kamen auch Keime ohne Geißeln vor. Auffällig war, daß sich unter stark beweglichen Keimen stets in geringer Zahl kurze Stäbchen befanden, die mit 4 Geißeln ausgestattet waren. Die Begeißelung war peritrich. Kulturen, die 24 Stunden bei 37°C bebrütet worden waren, wiesen überwiegend unbegeißelte Stäbchen auf, daneben konnten gelegentlich kurze Geißelstummel gefunden werden.

Literaturnachweis

1. Bergey, D.H. — Manual of determinativ bacteriogy 7. ed. Baltimore: Williams & Wilkens (1957)

2. Bradley, D.E. — A study of the negativ staining process. J.Gen.Microbiol. 29, 503 (1962)

3. Brenner, S. u. R.W. Horne — A negativ staining method for high resolution electron microscopy of virus Biochem.biophysica acta 34, 103 (1959)

4. Dowell, W.E.T. — Stable substrates on annular dises 4. Internat. Kongress f. elektronenmikroskop. Mikrobiologie Mikrobiologie 1, 375 (1960)

5. Fuhs, G.W. u. H. Seeliger — Zur Begeißelung von Listeria monocytogenes Arch.Mikrobiol. 40, 153 (1961)

6. Grund, S. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Brucella in verschiedenen Wachstumsstadien Berl.Münch.tierärztl.Wschr.77, 46 (1964)

7. Hallmann, L. — Bakteriologie und Serologie 3. Aufl. Stuttgart: Thieme (1961)

8. Hartwigk, H. u. S. Grund — Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Listeria monocytogenes Zbl. Vet.med. 3, 232 (1956)

9. Haupt, H. — Medizinisch-bakteriologische Diagnostik für Ärzte und Tierärzte Stuttgart: Einke (1964)

10. Kauffmann, E. — Vergleichende Untersuchungen an Pseudotuberculose, Paratyphus-, Pasteurella- und Pestbacillen Zschr. Hyg. 114, 97 (1933)

11. Knapp, W. — Ein Beitrag zur Beweglichkeit von Pasteurella pseudotuberculosis
Zschr. Hyg. 142, 219 (1955/56)

12. Levinthal, W. — Eine neue Technik der Beweglichkeitsprüfung an lebenden Bakterien
Zschr. Hyg. 111, 140 (1930)

13. Lowy, J. u. J.Hanson — Structure of bacterial flagella
Nature 558, 202 (1964)

14. Mach, F. — Beobachtung über die Fortsatzstrukturen eines Streptomyces olevaceus-Phagen
Naturwiss. 49, 142 (1963)

15. Maßhoff, W. — Eine neuartige Form der mesenterialen Lymphadenitis
Dtsch.med.Wschr. 78, 532 (1953)

16. Maßhoff, W. u. W. Dölle — Die abzendierende reticulocytäre Lymphadenitis
Virchows Arch.path.Anat. 323, 664 (1953)

17. Peters, D., G. Müller u. R. Geister — Zur Deutung sogenannter inkompletter Formen bei der Negativkontrastierung von Viren
Arch.Virusforsch. 123, 437 (1962)

18. Preston, N.W. u. H.B.Maitland — The influence of temperatur on the motility of Pasteurella pseudotuberculosis
J.Gen.Microbiol. 7, 117 (1952)

19. Schütze, H. — Bacterium pseudotuberculosis rodentium. Rezeptorenanalyse von 18 Stämmen
Arch.Hyg. 100, 180 (1928)

20. Seeliger, H. — Listeriose
Leipzig: Barth (1955)

21. Stouthamer, A.H., W.Th. Daems u. J.Eigner — Electron microscope studies of bacteriophage adsorption with negativ and positiv staining
Virology 20, 246 (1963)

22. Thal, E. Untersuchungen über Pasteurella pseudotuberculosis
15. Internat. Tierärztl.Kongreß Stock - holm
Proceedings P.1 Vol.1, 67 (1953)

23. Thal, E. Untersuchungen über Pasteurella pseudotuberculosis unter Berücksichtigung ihres immunologischen Verhaltens
Stockholm, Vet.med.Diss.1954
Ref.Nord.vet.med. 6, 829 (1954)

24. Thornley, M.J. u.R.W.Horne Electron microscope observations on the structure of fimbriae, with particular reference to Klebsiella strains, by the use of the negativ staining technique
J.Gen.Microbiol. 28, 51 (1962)

25. Weitzenberg,R. Über die Beweglichkeit des Bacteriums pseudotuberculosis rodentium
Zbl.Bakt.I Orig. 133, 343 (1933)

Am Ende dieser Arbeit ist es mein besonderer Wunsch, Herrn Prof. Dr. H. Hartwigk recht herzlich für die Überlassung des Themas zu danken. Seine hilfsbereite Unterstützung und seine immer wieder anspornenden Worte werden mir stets in angenehmer Erinnerung bleiben.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Grund, der mich bei der Fertigstellung des elektronenmikroskopischen Abschnittes hilfsbereit unterstützte.

Allen anderen Institutsangestellten möchte ich hiermit für die gute Aufnahme in ihrem Kreis meinen Dank sagen.

Lebenslauf

Mein Name ist Jürgen Lohe. Ich wurde am 7.Oktober 1938 als Sohn des kaufmännischen Angestellten Artur Lohe in Guben geboren.

In Guben besuchte ich die Grund- und Oberschule. 1953 trat ich der Freien Deutschen Jugend bei. Im Mai 1957 legte ich mein Abitur ab.

Im September 1957 ging ich nach West-Berlin und bestand hier im Sommer 1958 das Ergänzungsabitur. Nach einem kurzen Aufenthalt in Velbert begann ich mit dem Wintersemester 1958/59 das Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität zu Berlin.

Hier bestand ich 1960 das Vor- und das Physikum. Im Dezember 1963 legte ich an dieser Fakultät mein Staatsexamen mit der Note "gut" ab. Von Januar bis Juli 1964 absolvierte ich meine Praktikantenzeit bei Herrn Dr.C.A. Hülsbruch in Rhynern (Westfalen).

Im August 1964 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

Seit Oktober 1964 bin ich im Institut für Veterinärhygiene der Freien Universität beschäftigt, zunächst für ein Jahr als wissenschaftliche Hilfskraft und danach als Doktorand.